

小儿喘宝对哮喘大鼠血清及肺泡灌洗液 Th1/Th2 平衡的影响

陈 诚 李 明 周耀庭 刘仁慧 师一民

(首都医科大学中医药学院,北京,100069)

摘要 目的:研究小儿喘宝对哮喘大鼠血清及肺泡灌洗液中 Th1/Th2 平衡的影响,探索其治疗哮喘的作用机制。方法:采用卵蛋白(OVA)致敏、激发的方式制作大鼠慢性哮喘模型,以地塞米松为对照药。通过对哮喘大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞涂片中嗜酸性粒细胞(EOS)的计数,血清及肺泡灌洗液(BALF)中 IFN- γ 、IL-4 含量以及 IFN- γ /IL-4 比值的测定,探索小儿喘宝治疗哮喘大鼠的作用机制。结果:小儿喘宝可减轻大鼠的哮喘症状,减少 BALF 中 EOS 的数量,降低血清及 BALF 中 IL-4 的含量,升高血清及 BALF 中 IFN- γ 的含量,升高 IFN- γ /IL-4 的比值。结论:小儿喘宝能升高哮喘大鼠血清及肺泡灌洗液中 IFN- γ /IL-4 的比值,从而纠正失衡的 Th1/Th2,这可能是小儿喘宝调节哮喘的作用机制之一。

关键词 小儿喘宝;哮喘;Th1/Th2

The Effect of Xiao'er Chuanbao Decoction on the Balance of Th1/Th2 in Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid of Asthma Rats

Chen Cheng, Li Ming, Zhou Yaoting, Liu Renhui, Shi Yimin

(Traditional Chinese Medicine School of Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Xiao'er Chuanbao decoction on Th1/Th2 balance in asthma rats and its mechanism. **Methods:** To make the chronic asthma models by Ovalbumin(OVA) sensitizing and stimulating. Dexamethasone was used as the control drug. To explore the mechanism of Xiao'er Chuanbao decoction in treating asthmatic rats by counting the number of eosinophils (EOS) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), determining the contents of IFN- γ , IL-4 in serum and BALF, and calculating the ratio of IFN- γ and IL-4. **Results:** Xiao'er Chuanbao decoction can relieve asthma symptoms reduce the number of EOS in BALF, raise the level of IL-4 in serum and BALF deduce the level of IFN- γ and increase IFN- γ /IL-4 ratio. **Conclusion:** Xiao'er chuanbao decoction can rise the ratio of IFN- γ /IL-4, and thus balancing Th1/Th2. This might be its mechanism in treating asthma.

Key Words Xiao'er Chuanbao decoction; Asthma;Th1/Th2

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.02.032

儿童支气管哮喘是严重威胁儿童身体健康的疾病之一,近年来由于自然环境和生活习惯的改变,该病在我国呈现明显的上升趋势。目前,在我国有约 1 000 万左右的儿童罹患该病^[1]。国家级名老中医周耀庭教授在儿童支气管哮喘的发病及治疗方面具有独到见解,强调治疗儿童支气管哮喘应始终贯彻“祛痰蠲饮”的治疗方针。其创制的小儿喘宝是以麻黄、黄芩、瓜蒌、代赭石等药物为主组成的复方,在前期临床运用中获得显著疗效^[2]。为进一步明确小儿喘宝治疗哮喘的作用机制,本实验将从其对血清和肺泡灌洗液中 Th1/Th2 平衡的影响角度进行研究。

1 资料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠,36 只,体重(180 $\pm$ 20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司购入,动物合格证号:SCXK(京)2012-0001。各组大鼠喂养常规饲料,自由进食饮水,适应性饲养 3 d。

1.2 实验药物 “小儿喘宝”,麻黄、黄芩、瓜蒌、代赭石等,均购自北京同仁堂店,水煎。其中小儿喘宝高剂量为 2.42 g/mL、小儿喘宝中剂量 1.21 g/mL、小儿喘宝低剂量 0.605 g/mL。

醋酸地塞米松片,0.75 mg/片 $\times$ 100,浙江仙琚制药股份有限公司,批号:130309,配置成 0.05 g/mL 水溶液。

基金项目:北京市教育委员会 2014 年首都中医药研究专项(编号:14ZY03);北京中医药“薪火传承 3+3 工程”周耀庭名老中医工作室项目;周耀庭全国名老中医药专家传承工作室建设项目

作者简介:陈诚(1990.06—),男,硕士研究生,研究方向:方剂配伍规律及功效机制研究,E-mail:chengchen5790@163.com

通信作者:李明(1963.11—),女,大学本科,副教授,研究方向:方剂配伍规律及功效机制研究,E-mail:13611386113@163.com

1.3 实验试剂和仪器 卵蛋白(批号:SLBG1256V, Sigma);氢氧化铝(批号:201112261,北京化工厂);IL-4Elisa 试剂盒(批号:230440715,北京环亚泰克公司);IFN- γ Elisa 试剂盒(批号:238041231,北京环亚泰克公司);402AI 超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备有限公司);Biofuge15R 离心机(德国 Heraeus 公司);MODEL680 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.4 动物造模与分组 实验大鼠适应性饲养后,将其随机分为6组,即正常对照组(A组)、哮喘模型组(B组)、激素组(C组)、小儿喘宝高剂量组(D组)、小儿喘宝中剂量组(E组)、小儿喘宝低剂量组(F组),每组6只。采用卵蛋白致敏和雾化激发的方式建立哮喘模型^[3]。除A组外,其余各组分别于实验的第1天、第8天用新鲜配制的卵蛋白100 mg + 氢氧化铝200 mg + 生理盐水1 mL 的混悬液分别在大鼠两侧腹股沟、前足跖做皮下注射,每点0.2 mL,同时腹腔注射0.2 mL,共4点。再于实验第15~35天,每天喂药后分批将致敏的大鼠置于密闭容器内,给予1%卵蛋白生理盐水进行超声雾化吸入25 min/d,雾化流量为3 mL/min,连续21 d,以激发哮喘。在雾化过程,各组大鼠出现不同程度的烦躁不安、呼吸增快、腹肌抽搐等表现。正常对照组以等量生理盐水进行两侧腹股沟、前足跖皮下注射、腹腔注射和雾化,方法同上。实验第36天处死大鼠。

1.5 给药方法 从实验第8天开始给各组大鼠灌胃给药,1次/d。D、E、F组,分别给予小儿喘宝水煎液24 g、12 g、6 g 生药/(kg·d)。C组给予醋酸地塞米松溶液0.5 mg/(kg·d)。A组和B组给予生理盐水。以上各组大鼠的给药量为1 mL/100 g。

1.6 观察指标与方法 实验第36天,给药后1 h,常规消毒,以10%水合氯醛3.5 mL/kg 对大鼠进行腹腔注射,待大鼠麻醉后,打开腹腔,腹主动脉取血,室温静置2 h后,以3 000 r/min 的转速离心20 min,取血清,用ELISA 试剂盒测定血清中IL-4、IFN- γ 的含量(pg/mL)。然后向上打开胸腔,向上剪开颈部皮肤,钝性分离气管,于环状软骨处剪断气管,将5 mL 注射器的针管去除,套上蓝色枪头插入气管,经气管向肺叶注射冰的生理盐水4 mL,轻轻按摩肺组织30 s后,缓慢回吸BALF,反复3次,回收率>80%,将回收的BALF以1 500 r/min 的转速离心10 min,取上清液,用ELISA 试剂盒测定血清中IL-4、IFN- γ 的含量(pg/mL)。

1.7 统计方法 运用SPSS 11.5 软件包进行数据统计分析,数值采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用

ANOVA 分析,方差齐者用LSD 检验,不齐者用Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察 A组大鼠在受到激发后呼吸节律规整,活跃好动,毛色光泽,腹部正常起伏,无抽搐。B组大鼠受到激发后出现呼吸急促、加深加快,烦躁不安,咳嗽频频,挠鼻,反应迟缓,精神不振,毛色光泽差,并有脱毛,腹肌时有抽搐,腹式呼吸明显,拱背蜷卧等症状。C组和D、E、F组大鼠受到激发后呼吸略微加快,反应较灵敏,略有烦躁、咳嗽,精神尚佳,毛色略显暗淡,偶有腹肌抽搐。

2.2 小儿喘宝对哮喘大鼠BALF 细胞涂片中EOS 数量的影响 与A组比较,B组细胞涂片里的EOS 数量较A组显著增多($P < 0.01$);与B组比较,C组和E、F组EOS 数量显著减少($P < 0.01$);与D组比较,F组EOS 数量明显减少($P < 0.05$)。见表1。

表1 大鼠BALF 细胞涂片中EOS 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	EOS 数量/200 细胞
A 组	6	1.08 $\pm$ 0.38
B 组	6	2.54 $\pm$ 0.46 $\Delta\Delta$
C 组	6	1.25 $\pm$ 0.69 **
D 组	6	2.08 $\pm$ 0.49
E 组	6	1.33 $\pm$ 0.41 **
F 组	6	1.17 $\pm$ 0.49 ***

注:与A组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$;与B组比较 $^{**} P < 0.01$;与D组比较 $^{*} P < 0.05$ 。

2.3 小儿喘宝对哮喘大鼠血清中IFN- γ 、IL-4、IFN- γ /IL-4 的影响 与A组比较,B组血清中IFN- γ 含量较正常组有显著性降低($P < 0.01$);与B组比较,C组和E、F组血清中IFN- γ 含量有显著性升高($P < 0.01$);与D组比较,F组血清中IFN- γ 含量有显著性升高($P < 0.01$);与E组比较,F组血清中IFN- γ 含量有明显升高($P < 0.05$)。与A比较,B组血清中IL-4 含量较A组有显著性升高($P < 0.01$);与B组比较,C组和E、F组血清IL-4 含量显著性降低($P < 0.01$),D组有明显降低($P < 0.05$);与D组比较,F组血清IL-4 含量有明显降低($P < 0.05$)。与A组比较,B组动物血清中IFN- γ /IL-4 比值较A组有显著性降低($P < 0.01$);与B组相比,C组和F组血清中IFN- γ /IL-4 比值有显著性升高($P < 0.01$),E组血清中IFN- γ /IL-4 比值有明显升高($P < 0.05$);与D组相比,F组血清中IFN- γ /IL-4 比值有显著性升高($P < 0.01$)。见表2。

2.4 小儿喘宝对哮喘大鼠支气管肺泡灌洗液中IFN- γ 、IL-4、IFN- γ /IL-4 的影响 与A组比较,B组

支气管肺泡灌洗液中 IFN- γ 含量较 A 组有显著性降低($P<0.01$);与 B 组相比,F 组支气管肺泡灌洗液中 IFN- γ 含量有显著性升高($P<0.01$),C 组和 E 组支气管肺泡灌洗液中 IFN- γ 含量有明显升高($P<0.05$);与 D 组比较,F 组支气管肺泡灌洗液中 IFN- γ 含量有明显升高($P<0.05$)。与 A 组比较,B 组支气管肺泡灌洗液中 IL-4 含量较 A 组有显著性升高($P<0.01$);与 B 组比较,C 组和 F 组支气管肺泡灌洗液中 IL-4 含量有显著性降低($P<0.01$),E 组含量有明显降低($P<0.05$);与 D 组比较,F 组支气管肺泡灌洗液中 IL-4 要明显低于 D 组($P<0.05$)。与 A 组比较,B 组动物支气管肺泡灌洗液中 IFN- γ /IL-4 比值较 A 组有显著性降低($P<0.01$);与 B 组相比,E、F 组支气管肺泡灌洗液中的 IFN- γ /IL-4 比值有显著性升高($P<0.01$),C 组支气管肺泡灌洗液中的 IFN- γ /IL-4 比值较 B 组有明显升高($P<0.05$);与 D 组比较,F 组支气管肺泡灌洗液中 IFN- γ /IL-4 比值有明显升高($P<0.05$)。见表 3。

表 2 大鼠血清中 IFN- γ 、IL-4、IFN- γ /IL-4 的变化($\bar{x}\pm s$)

组别例数	IFN- γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IFN- γ /IL-4
A 组 6	147.25 $\pm$ 27.65	8.58 $\pm$ 4.59	7.86 $\pm$ 3.32
B 组 6	59.16 $\pm$ 15.32 $\triangle\triangle$	17.74 $\pm$ 2.45 $\triangle\triangle$	3.67 $\pm$ 1.24 $\triangle\triangle$
C 组 6	97.66 $\pm$ 32.50**	7.38 $\pm$ 3.33**	7.81 $\pm$ 2.42**
D 组 6	73.60 $\pm$ 17.22	13.52 $\pm$ 2.29*	5.45 $\pm$ 1.12
E 组 6	94.80 $\pm$ 12.70**	11.94 $\pm$ 3.68**	6.96 $\pm$ 2.04*
F 组 6	121.81 $\pm$ 16.13*** $\blacktriangle$	8.61 $\pm$ 2.60*** $\blacktriangle$	9.51 $\pm$ 2.93*** $\blacktriangle$

注:与 A 组比较 $\triangle\triangle P<0.01$;与 B 组比较* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 D 组比较 $\blacktriangle P<0.05$,*** $P<0.01$;与 E 组比较 $\blacktriangle P<0.05$ 。

表 3 大鼠支气管肺泡灌洗液中 IFN- γ 、IL-4、IFN- γ /IL-4 的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	IFN- γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IFN- γ /IL-4
A 组	6	96.74 $\pm$ 31.76	7.37 $\pm$ 2.57	9.96 $\pm$ 2.64
B 组	6	46.95 $\pm$ 10.83 $\triangle\triangle$	14.55 $\pm$ 4.43 $\triangle\triangle$	3.40 $\pm$ 1.73 $\triangle\triangle$
C 组	6	73.44 $\pm$ 15.07*	10.12 $\pm$ 2.60**	6.68 $\pm$ 2.53*
D 组	6	60.81 $\pm$ 17.05	11.90 $\pm$ 2.17	5.80 $\pm$ 1.05
E 组	6	72.66 $\pm$ 24.80*	10.53 $\pm$ 1.56*	7.18 $\pm$ 2.06**
F 组	6	89.51 $\pm$ 18.92*** $\blacktriangle$	7.96 $\pm$ 1.92*** $\blacktriangle$	9.45 $\pm$ 2.14*** $\blacktriangle$

注:与 A 组比较 $\triangle\triangle P<0.01$;与 B 组比较* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 D 组比较 $\blacktriangle P<0.05$ 。

3 讨论

支气管哮喘是由多种炎性细胞和炎性反应递质介导的慢性呼吸道疾病,儿童哮喘主要表现为反复发作性喘息、呼吸困难、咳嗽、胸闷,发病机制极为复杂^[4]。近来研究表明,哮喘的发病过程与 Th 活化并分泌多种细胞因子有密切联系,正常情况下 Th1 和 Th2 细胞处于相对平衡的状态,维持着机体的正常

免疫功能^[5]。目前普遍认为当机体受到异常抗原刺激后,Th1/Th2 的正常平衡被打破,此时 Th2 细胞优势分化、Th1 细胞分化相对弱势,就会出现炎性细胞的趋化、成熟、聚集,导致严重的炎性反应。因此,Th1/Th2 失衡是哮喘发生的重要机制^[6]。

Th1 细胞主要分泌 IL-2、IFN- γ 、肿瘤坏死因子(TNF- α 、TNF- β)等细胞因子,激活巨噬细胞,发生迟发超敏反应;Th2 细胞主要产生 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 等细胞因子,诱导嗜酸性粒细胞募集,引起气道炎症反应^[7]。在影响哮喘的细胞因子中,IFN- γ 和 IL-4 是一对互为拮抗的细胞因子,IFN- γ 能抑制 IL-4mRNA 转录,减轻 EOS 的浸润,降低气道炎症反应,同时还可以抑制免疫球蛋白的合成,对气道起到保护作用,是 Th1 细胞分泌的拮抗哮喘发作的关键因子。IL-4 则能诱导分泌促嗜酸性粒细胞聚集的细胞因子和促炎性反应因子,加重气道炎症反应、气道重塑和气道高反应性,是 Th2 分泌的重要的促炎性细胞因子。IFN- γ 和 IL-4 分别是 Th1 和 Th2 细胞的特征性细胞因子,所以常用 IFN- γ /IL-4 来反映 Th1/Th2^[8-11]。

本实验研究发现,哮喘模型组大鼠 BALF 细胞涂片中 EOS 的数量较正常组显著性增多,提示发生了 EOS 的大量浸润,出现了严重的气道炎症反应。给予激素和中、低剂量的小儿喘宝后,大鼠 BALF 细胞涂片中的 EOS 数量较模型组均出现显著性减少,这说明激素和中、低剂量的小儿喘宝均有抑制气道炎症反应的作用。通过对大鼠血清的 IFN- γ 和 IL-4 检测中发现,哮喘大鼠的 IFN- γ 较正常大鼠显著性降低,IL-4 较正常大鼠显著性升高,这表明 Th2 细胞优势分化,Th2 细胞分化相对弱势,Th1/Th2 的正常平衡被打破。但在给予哮喘大鼠中、低剂量的小儿喘宝之后,其血清中的 IFN- γ 含量比模型组大鼠有了显著性的上升,且低剂量组比中剂量组上升更明显;高、中、低剂量的小儿喘宝,均能明显降低 IL-4 的含量,其中低剂量组下降最为显著。对 IFN- γ /IL-4 进行计算发现,中、低剂量组的 IFN- γ /IL-4 比值均明显高于模型组。另外,本实验通过检测了大鼠肺泡灌洗液(BALF)中的 IFN- γ 和 IL-4 含量,发现中、低剂量的小儿喘宝均能够明显升高哮喘大鼠 BALF 中 IFN- γ 含量,并降低 IL-4 含量,中、低剂量组的 IFN- γ /IL-4 比值均明显高于模型组。本实验从大鼠整体(血清)和局部(肺泡灌洗液)的角度说明:中、低的剂量小儿喘宝可以有效的抑制 Th2 的活化,并促进 Th1 的生成,使不平衡的 Th1/Th2 回归平衡状

态,从而起到减轻哮喘发作的效果。

支气管哮喘病情顽固,迁延难愈,张仲景在《金匱要略》中记载“膈上病痰,满喘咳吐,发则寒热……必有伏饮”。明确提出,哮喘病反复发作的病机是“伏饮”,哮喘的发病是因为宿痰伏肺,外邪引触,痰气交阻^[12]。伏饮存在于哮喘的发作期和缓解期,化痰逐饮,消除宿痰是探寻治疗哮喘的重要治疗原则^[13]。小儿素体阳盛,受外邪侵袭后容易从火化热,且小儿常有消化不良,食滞等症状,故临床上以热性哮喘较为常见^[14]。肺主气,司呼吸,肺是人体气机升降的枢纽。气机升降正常,则呼吸通畅,气机逆乱,则喘息发作^[15]。周耀庭教授创制的小儿喘宝集解表、清热、理气、祛痰于一方以去除顽邪,共奏宣肺平喘、清热化痰及宣降气机之功。

综上所述:小儿喘宝能纠正哮喘大鼠血清及肺泡灌洗液中失衡的 Th1/Th2。中、低剂量的小儿喘宝能显著性减少哮喘大鼠 BALF 细胞涂片中的 EOS 数量,减轻炎症反应;同时可以升高哮喘大鼠血清和 BALF 中的 IFN- γ ,降低血清和 BALF 中的 IL-4,从而升高 IFN- γ /IL-4 比值,逆转失衡的 Th1/Th2 状态。本实验通过不同剂量的小儿喘宝干预哮喘大鼠模型实验,证实了中、低剂量的小儿喘宝能够有效的减轻哮喘的发作,调节血清和 BALF 中的 Th1/Th2 失衡,这可能是本方治疗支气管哮喘的作用机制之一,提示小儿喘宝在治疗哮喘方面有良好的应用前景。

参考文献

- [1] 张杨. 中西医结合对小儿哮喘的认识综述[D]. 北京:北京中医药大学,2011.
- [2] 安俊英,李明,高雪松. 周耀庭教授治疗儿童哮喘 100 例回顾性研究[J]. 现代中医药,2013,33(5):5-7.
- [3] Fang xiangming, Li jun, Li zegeng, et al. Functional mechanism of

Pingchuanning Decoction on adjustment of clara cell secretory protein in airway remodeling of asthmatic rats[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine,2012,32(2):215-221.

- [4] 高旅,浦佳希,吴丽萍. 中医药对儿童哮喘的认识及研究进展[J]. 中医儿科杂志,2015,11(1):70-74.
- [5] 成争艳,陈庄. Th1/Th2 平衡调节与哮喘的免疫治疗[J]. 现代预防医学,2008,35(19):3888-3890.
- [6] Ji N, Xie Y, Zhang M, et al. Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model[J]. International Immunopharmacology,2014,21(1):76-81.
- [7] 杨华,黄桂红. Th1/Th2 细胞因子失衡在哮喘发病机制中的作用[J]. 临床肺科杂志,2013,18(12):2271-2272.
- [8] 尹德锋,熊瑛. IL-4、IFN- γ 和 TGF- β 1 在支气管哮喘发病过程中的作用[J]. 临床合理用药杂志,2014,7(6):161-163.
- [9] 姚金晶,陈宜涛. Th1/Th2 平衡调节与疾病发生的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2009,9(13):2597-2600.
- [10] Alonso MN, Wong MT, Zhang AL, et al. TH1, TH2, and TH17 cells instruct monocytes to differentiate into specialized dendritic cell subsets[J]. Blood,2011,118(12):3311-3320.
- [11] Ma C H, Ma Z Q, Fu Q, et al. Ma Huang Tang ameliorates asthma though modulation of Th1/Th2 cytokines and inhibition of Th17 cells in ovalbumin-sensitized mice[J]. Chin J Nat Med,2014,12(5):361-366.
- [12] 宿英豪,苏奎国,杨梅,等. 支气管哮喘缓解期中医治疗现状[J]. 现代中西医结合杂志,2014,23(18):2045-2047.
- [13] 高旅,浦佳希,吴丽萍. 中医药对儿童哮喘的认识及研究进展[J]. 中医儿科杂志,2015,23(18):70-74.
- [14] 黄晓帅. 清热泻肺化痰散瘀法治疗儿童哮喘急性期热哮证的临床研究[D]. 南京:南京中医药大学,2011.
- [15] 崔红生.《内经》“和”思想在支气管哮喘防治中的意义[J]. 北京中医药大学学报,2013,36(12):802-804.

(2015-09-15 收稿 责任编辑:王明)

作者声明

本刊 2015 年第 12 期第 1957 页,《中医高校教育信息化评估体系优化路径的探讨》一文第一作者项馨立单位更改为:1) 南京中医药大学(攻读研究生单位);2) 江苏省第二师范学院(工作单位)。特此声明!